

**BIOLABO**
**www.biolabo.fr**

**FABRICANTE:**
**BIOLABO SAS,**
Les Hautes Rives
02160, Maizy, France

# BILIRRUBINA TOTAL Y DIRECTA

## Método Acido sulfanílico

Reactivo para la determinación cuantitativa de la bilirrubina total (acelerador: DMSO) y directa en plasma o suero humano.

| | | |
|---|---|---|
| REF 80403 : | **R1** 1 x 200 mL<br>**R2** 1 x 200 mL<br>**R3** 1 x 40 mL | Bilirrubina Total<br>Bilirrubina Directa<br>Solución Nitrito |
| REF 80443 : | **R1** 2 x 200 mL<br>**R3** 1 x 40 mL | Bilirrubina Total<br>Solución Nitrito |
| REF 80553 : | **R2** 2 x 200 mL<br>**R3** 1 x 40 mL | Bilirrubina Directa<br>Solución Nitrito |

**CODIGO CNQ : PJ**

**SOPORTE TECNICO Y PEDIDOS**
**Tel: (33) 03 23 25 15 50**
**Fax: (33) 03 23 256 256**

CE

IVD **USO IN VITRO**

## SIGNIFICACION CLINICA (1) (6)

Por lo menos cuatro clases de bilirrubina coexisten en el suero: la **bilirrubina directa (BD)** corresponde a la bilirrubina llamada mono y diconjugada (β y γ Bilirrubina) así como a la fracción δ que esta ligada muy fuertemente a la albúmina; la bilirrubina α, no conjugada o bilirrubina indirecta, que es transportada por la albúmina. La **bilirrubina total (BT)** es la suma de estas diferentes formas.
Se distinguen las ictericias donde predomina la bilirrubina indirecta (ictericia hemolítica, enfermedad de Biermer, Talasemia...etc.) de la ictericia donde predomina la bilirrubina directa (obstrucción de las vías biliares extra o intrahepáticas, hepatitis virales...etc.). Finalmente, las ictericias donde están presentes ambas formas de bilirrubina, como en la cirrosis y enfermedad de Dubin-Johnson.

## PRINCIPIO (4) (5)

Reacción entre la bilirrubina y el ácido sulfanílico diazotado que conduce a un compuesto, la azobilirrubina, coloreado en medio muy ácido o básico.

Principio de Mallos-Evelyn modificado por Walters y al: en solución acuosa, solo la BD reacciona. Para determinar la BT es necesario romper la relación entre la bilirrubina indirecta y la albúmina. Esta etapa es realizada por la adición de dimetilsulfóxido (DMSO).

La absorbencia de la azobilirrubina así producida es proporcional a la concentración en bilirrubina y es medida a 550 nm (530-580).

## REACTIVOS

**Vial R1** **BILIRRUBINA TOTAL**

| | | |
|---|---|---|
| Acido sulfanílico | 30 | mmol/L |
| DMSO | 7 | mol/L |
| Acido clorhídrico | 130 | mmol/L |

**Vial R2** **BILIRUBINA DIRECTA**

| | | |
|---|---|---|
| Acido sulfanílico | 30 | mmol/L |
| Acido clorhídrico | 130 | mmol/L |

**Vial R3** **SOLUCION NITRITO**

| | | |
|---|---|---|
| Nitrito de sodio | 0,74 | mmol/L |

## PRECAUCIONES

Los reactivos BIOLABO están destinados a personal cualificado, para uso in vitro.

- Verificar la integridad de los reactivos antes de su utilización.
- Utilizar equipamientos de protección (bata, guantes, gafas).
- No pipetear con la boca.
- En caso de contacto con la piel o los ojos, enjuagar abundantemente y consultar al médico.
- La ficha de datos de seguridad puede obtenerse por petición.
- Eliminación de los deshechos: respetar la legislación en vigor.

Por medida de seguridad, tratar toda muestra como potencialmente infecciosa. Respetar la legislación en vigor.

## PREPARACION DE LOS REACTIVOS

Los reactivos están listos para el uso.
Para las rutinas importantes o para utilización sobre autómata, es posible preparar un monoreactivo respetando las siguientes proporciones: R1 o R2 (20 volúmenes) + R3 (1 volumen).

## ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

**Almacenar a 2-8°C, en el vial de origen bien cerrado y protegido de la luz.**

- Los reactivos (viales R1, R2, R3) son estables en ausencia de contaminación son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si son utilizados y almacenados en las condiciones adecuadas.
- El reactivo de trabajo BT es estable 2 días a 2-8°C.
- El reactivo de trabajo BD estable 7 días a 2-8°C.

No utilizar los reactivos si están turbios o muy coloreados (Abs.> 0.100 a 550 nm).
No utilizar los reactivos de trabajo después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja.

## TOMA Y PREPARACION DE LA MUESTRA (2) (7)

Suero o plasma (no hemolizados).
La bilirrubina es fotolábil. Almacenar la muestra protegida de la luz.

- Estabilidad en la muestra: 4 a 7 días a 2-8°C.
  2 días a temperatura ambiente.

Muestras pediátricas o ictéricas: ver § **MODO DE EMPLEO**.

## INTERFERENCIAS (3)

Hemoglobina: Baja-evaluación a partir de una concentración de 100 µmol/L (160 mg/dL) de hemoglobina.
Turbidez: No hay interferencia significativa para la BT.
No hay interferencia significativa para la BD hasta una concentración de triglicéridos equivalente a 4,6 mmol/L.

La reacción de formación de la diazobilirrubina es sensible a las variaciones de temperatura y debe ser puesta a temperatura constante.
Young D.S. ha publicado una lista de las sustancias que interfieren con la prueba.

## REACTIVOS Y MATERIAL COMPLEMENTARIOS

1. Equipamiento de base del laboratorio de análisis médico.
2. Sueros de control normales y patológicos.

## CALIBRACION (8)

Utilizar el factor experimental indicado en el § **CALCULO** o un calibrador trazable sobre una solución o un método de referencia, BIOLABO Multicalibrator REF 95015 trazable sobre SRM 916a.
La frecuencia de calibración depende de las prestaciones del analizador y de las condiciones de conservación del reactivo.
Se recomienda calibrar de nuevo en los siguientes casos:
1. Cambio de lote de reactivo.
2. Después de operaciones de mantenimiento sobre el analizador.
3. Los valores de control obtenidos salen de los límites de confianza, incluso después de la utilización de un segundo vial de suero de control recién reconstituido.

## CONTROL DE CALIDAD    CODIGO CNQ: PJ

- BIOLABO EXATROL-N Tasa I REF 95010.
- BIOLABO EXATROL-P Tasa II REF 95011.
- Cualquier otro suero de control titulado para este método.
- Programa externo de control de calidad.

Se recomienda controlar en los siguientes casos:

- Al menos un control por rutina.
- Al menos un control cada 24 horas.
- Cambio de vial del reactivo.
- Después de operación de mantenimiento sobre el analizador.

Cuando un valor de control se encuentra fuera de los límites de confianza recomendados, aplicar las siguientes acciones correctivas:

1. Repetir el test utilizando el mismo control.
2. Si el valor obtenido queda fuera de los límites, preparar un suero de control recién reconstituido y repetir el test.
3. **Con factor:** Verificar los parámetros del análisis: longitud de onda, temperatura, volumen muestra/volumen reactivo, tiempo de medida y factor de calibración.
4. Utilizar otro vial de reactivo y repetir el test.
5. **Con calibrador:** Si el valor obtenido queda fuera de los límites, utilizar otro calibrador o un calibrador recién reconstituido y repetir el test.
6. Si el valor obtenido queda fuera de los límites, utilizar otro vial de reactivo y repetir el test.
7. Si el valor obtenido queda fuera de los límites, contactar el servicio técnico BIOLABO o el distribuidor local.

## INTERVALOS DE REFERENCIA (2)

| Bilirrubina total | (mg/dL) | | [µmol/L] | |
|---|---|---|---|---|
| Recién-nacido | Prematuro | a término | Prematuro | a término |
| En el cordón | < 2.0 | < 2.0 | [< 34] | [< 34] |
| 0-1 día | < 8.0 | 1.4-8.7 | [< 137] | [24-149] |
| 1-2 días | < 12.0 | 3.4-11.5 | [< 205] | [58-197] |
| 3-5 días | < 16.0 | 1.5-12.0 | [< 274] | [26-205] |

| Adulto | Bilirrubina total | | Bilirrubina directa | |
|---|---|---|---|---|
| (y niño > 5 días) | mg/dL | [µmol/L] | mg/dL | [µmol/L] |
| > 5 días-60 años | 0.3-1.2 | [5-21] | < 0.2 | [< 3.4] |
| 60-90 años | 0,2-1.1 | [3-19] | < 0,2 | [< 3.4] |
| > 90 años | 0.2-0.9 | [3-15] | < 0.2 | [< 3.4] |

Se recomienda a cada laboratorio definir sus propios intervalos de referencias para la población estimada.

## LIMITE DE LINEALIDAD

Modo operatorio n°1: hasta 20 mg/dL (342 µmol/L).
Más allá, **no diluir la muestra:** aplicar el modo operatorio n°2.
Modo operatorio n°2: hasta 100 mg/dL (1710 µmol/L)
Muestra pediátrica: aplicar el modo operatorio n°2

## PRESTACIONES (PROCEDIMIENTO N°1)

BILIRRUBINA TOTAL

| *Intra-serie N = 23* | *Tasa normal* | *Tasa elevada* |
|---|---|---|
| Media mg/dL | 0.68 | 4.13 |
| S.D. mg/dL | 0.02 | 0.104 |
| C.V. % | 2,94 | 2,52 |

| *Inter- serie N = 20* | *Tasa normal* | *Tasa elevada* |
|---|---|---|
| Media mg/dL | 0.67 | 3,85 |
| S.D. mg/dL | 0.022 | 0.07 |
| C.V. % | 3,27 | 1,78 |

BILIRRUBINA DIRECTA

| *Intra- serie N = 20* | *Tasa media* | *Tasa elevada* |
|---|---|---|
| Media mg/dL | 1.15 | 2.79 |
| S.D. mg/dL | 0.022 | 0.015 |
| C.V. % | 1,94 | 0,53 |

| *Inter- serie N = 20* | *Tasa media* | *Tasa elevada* |
|---|---|---|
| Media mg/dL | 1.09 | 2.74 |
| S.D.mg/dL | 0.028 | 0.09 |
| C.V. % | 2,6 | 3,3 |

<u>Límite de detección</u>: BT: aproximadamente 0.13 mg/dL (2,2 µmol/L)
BD: aproximadamente 0.18 mg/dL (3,1 µmol/L)
<u>Sensibilidad para 1 mg/dL</u>: 88 mAbs a 550 nm.
<u>Comparación con un reactivo comercial</u>:
BT: y = 1,0145 x + 0.00513  r = 0,9976
BD: y = 1,0002 x – 0,00796  r = 0,9972

## MODO DE EMPLEO (TECNICA MANUAL)

Poner los reactivos y muestras a temperatura ambiente.

### Procedimiento n°1 :

| Medir en tubos de ensayo: | BILIRRUBINA TOTAL | | BILIRRUBINA DIRECTA | |
|---|---|---|---|---|
| | **Blanco** | **Prueba** | **Blanco** | **Prueba** |
| **Reactivo R1** | 1 mL | 1 mL | | |
| **Reactivo R2** | | | 1 mL | 1 mL |
| **Agua destilada** | 50 µL | | 50 µL | |
| **Reactivo R3 (Nitrito)** | | 50 µL | | 50 µL |
| Mezclar | | | | |
| **Muestra** | 100 µL | 100 µL | 100 µL | 100 µL |

Mezclar bien y poner en marcha un cronómetro en el momento de la adición de la muestra.
Leer las absorbencias a 550 nm (530-580) contra los blancos
<u>BT</u> : lectura después ≥ 3 minutos a 37°C o ≥ 5 minutos a temperatura ambiente.
**<u>BD</u>** : lectura **a exactamente** 3 minutos a 37°C o 5 minutos a temperatura ambiente.

### Procedimiento n°2: Muestras pediátricas o ictéricas

| Medir en tubos de ensayo: | BILIRRUBINA TOTAL | | BILIRRUBINA DIRECTA | |
|---|---|---|---|---|
| | **Blanco** | **Prueba** | **Blanco** | **Prueba** |
| **Reactivo R1** | 1 mL | 1 mL | | |
| **Reactivo R2** | | | 1 mL | 1 mL |
| **Agua destilada** | 50 µL | | 50 µL | |
| **Reactivo R3 (Nitrito)** | | 50 µL | | 50 µL |
| Mezclar | | | | |
| **Muestra** | 20 µL | 20 µL | 20 µL | 20 µL |

Mezclar bien y poner en marcha un cronómetro en el momento de la adición de la muestra.
Leer las absorbencias a 550 nm (530-580) contra los blancos
<u>BT</u> : lectura después ≥ 3 minutos a 37°C o ≥ 5 minutos a temperatura ambiente.
**<u>BD</u>** : lectura **a exactamente** 3 minutos a 37°C o 5 minutos a temperatura ambiente.

**Nota**:

1. Hacer el cero sobre agua destilada <u>y escurrir bien</u> la cubeta. Leer primero todos los blancos de una serie y todas las pruebas vaciando bien la cubeta entre cada tubo, pero SIN ENJUAGAR CON AGUA : La mezcla de la solución reacciónale con trazas de agua provoca estrías que pueden falsear las medidas de absorbencia.
2. Procedimientos específicos están disponibles para los analizadores automáticos. Contactar el servicio técnico BIOLABO.

## CALCULO

**Con calibrador (Procedimiento n°1 únicamente):**

$$\text{Resultado} = \frac{\text{Abs(Ensayo - Blanco) determinación}}{\text{Abs (Ensayo - Blanco) calibrador}} \times \text{concentración del calibrador}$$

**Con factor**

Procedimiento n°1 : mg/dL = [Abs. ensayo – Abs. Blanco] x 11.4*
µmol/L = [Abs. ensayo – Abs. Blanco] x 195*

**Procedimiento n°2 : mg/dL = [Abs. ensayo – Abs. Blanco] x 53.0***
**µmol/L = [Abs. ensayo – Abs. Blanco] x 906***

***** Estos factores se dan a título indicativo y pueden variar ligeramente según el aparato utilizado y el lote de reactivo. Se aconseja verificarlos con la ayuda de un suero de control a tasa elevada (Procedimiento n°1 : utilizar BIOLABO EXATROL-P, Procedimiento n°2 : utilizar BIOLABO PAEDIATRIC CONTROL).

## BIBLIOGRAFIA


(1) *TIETZ N.W. Text book of clinical chemistry, 3rd Ed. C.A. Burtis, E.R. Ashwood, W.B. Saunders (1999) p. 1133-1137.*
(2) *Clinical Guide to Laboratory Test, 4th Ed., N.W. TIETZ (2006) p. 172-177.*
(3) *YOUNG D.S., Effect of Drugs on Clinical laboratory Tests, 4th Ed. (1995) p.3-90 à 3-110*
(4) *MALLOY H.T., EVELYN K., J Biol. Chem.(1937), 119, p.481-490*
(5) *WALTERS M, GERARDE H, Microchem J (1970) <u>15</u> , p.231-243*
(6) *BERNARD S., Biochimie clinique, 2ème éd. Maloine, (1989), p.127-129 et p.280-282.*
(7) *Henry RJ, Clin Chem : Principles and technics. Harper and Row,p.592 (1965).*
(8) *SRM: Standard Reference Material ®*



Fabricante


Fecha de caducidad


Uso in vitro

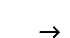
Temperatura de conservación


Referencia del producto

Consultar instrucciones

Numero de lote

Protegido de la luz

Suficiente para

Diluir con